

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/035574 A1(51) 国際特許分類: C07K 16/00, A61K 9/08,  
39/395, 47/02, 47/18, 47/26, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/014935

(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 8 日 (08.10.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-351388 2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中  
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目  
5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井川 智之  
(IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿  
場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内  
Shizuoka (JP). 関森 泰男 (SEKIMORI, Yasuo) [JP/JP];  
〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中  
外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
3000847 茨城県土浦市御町 1-1-1 関鉄つくばビル  
6 階 Ibaraki (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AR, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分。請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IgM HIGH CONCENTRATION STABILIZED SOLUTION

(54) 発明の名称: IgM 高濃度安定化溶液

(57) Abstract: The use of a compound containing a multi-valent cationic ion, such as magnesium chloride or arginine hydrochloride, as an additive, has allowed the inhibition of the association of IgM in a solution, resulting in the preparation of an IgM solution which has a high concentration and also is stable.

(57) 要約: 塩化マグネシウムや塩酸アルギニン等の多価カチオン性のイオンを含む化合物を添加物として用いることによって、溶液における IgM の会合化を抑制し、IgM の安定な高濃度溶液を調製しうることを見出した。

WO 2005/035574 A1

## 明 細 書

## IgM高濃度安定化溶液

## 技術分野

[0001] 本発明は、IgM高濃度安定化溶液およびその製造に関する。

## 背景技術

[0002] 多くの高等動物の免疫グロブリンには、5種類の異なったクラスIgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEが存在する。各クラスの免疫グロブリンは、大きさ、電荷、アミノ酸組成、糖含量等の性状が異なっている。これらのクラスの中で、IgMは血漿免疫グロブリン全体の約10%を占めている。IgMは、複雑な抗原性を持つ細胞膜抗原、感染性微生物、あるいは溶解性抗原に対して産生される初期抗体の主成分である。

[0003] ヒトIgMは、通常、5量体構造を有している。IgMの5量体構造を構成する5つのサブユニットは、IgGに類似した4本鎖構造からなっている。IgMのH鎖である $\mu$ 鎖はIgGのH鎖である $\gamma$ 鎖とアミノ酸配列が異なる以外にも次のような相違を有する。

- ・ $\mu$ 鎖は、定常領域のドメインを、 $\gamma$ 鎖よりも一つ余分に持っている。
- ・ $\mu$ 鎖は、オリゴ糖鎖の数が $\gamma$ 鎖と比較して4箇所多い。

[0004] IgMは、IgGには見られないJ鎖と呼ばれるポリペプチド鎖を有する。J鎖は、IgMが抗体産生細胞から分泌される前に、 $\mu$ 鎖の会合を補助すると考えられている。

[0005] 近年、モノクローナル抗体技術および組換えDNA技術の発展により、純粋な免疫グロブリンを大量に生産することが可能になった。更に遺伝子組み換え技術は、キメラ抗体やヒト化抗体生産を可能にした。キメラ抗体とは、可変領域を異なる種に由来する可変領域に組み換えた構造を有する抗体である。たとえば、ヒト以外の動物種の可変領域とヒト抗体の定常領域を有する「キメラ抗体」(非特許文献1／Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, (1984)81:6851)が公知である。更に、他の動物種の相補性決定領域(complementarity determining regions;CDR)をヒトイムノグロブリンに移植したヒト化抗体も公知である(非特許文献2／Nature (1986)321:521)。

[0006] 実際に、抗腫瘍抗体に関して列挙すると、抗CD20ヒトキメラ抗体であるリツキシサン(Rituxan:IDEC社)や抗HER2/neuヒト化抗体であるハーセプチン

(Herceptin: Genentech社)が臨床試験を終了し、既に承認・販売されている。IgGおよびIgMのエフェクター機能として抗体依存性細胞障害活性(以下、ADCC活性と表記する)や補体依存性細胞障害活性(以下、CDC活性と表記する)が知られている。IgMのCDC活性はIgGと比較して高いことから、CDC活性を主薬効とする抗腫瘍抗体となる可能性が極めて高いと思われる。しかし上述のとおり、IgMはIgGと異なり多量体を形成する。そのため、組換え体IgMを工業的規模で生産することは困難であると考えられていた。

[0007] また、IgMは、IgGに比べて極めて不安定であり、また溶解度が低いことから、IgMの高濃度且つ安定な溶液を作製することは困難である。例えば、Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242(非特許文献5)は、IgMの-20℃保存においても溶解時にIgMの沈殿および活性低下が起こったことを報告している。また、同文献には、IgMは保存時に会合化および沈殿を起こしやすいことが記載されている。特に、IgMについては、緩衝液種とpHの最適化のみでは、医薬品としての使用に耐えうる安定性を確保するのは困難であった。

[0008] そこで、緩衝液種とpHの最適化以外で、抗体を安定化させる種々の試みがなされている。例えば、WO2002/096457(特許文献1)においては、酸性成分を含有する抗体高濃度安定製剤が開示され、抗体の安定化のために $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ を添加剤として使用している。しかし、該公報における抗体安定化は、IgG製剤に関するものであって、IgMへの言及はない。上述したようにIgMはIgGと異なり多量体として存在し、本来的に安定なIgGとは異なり会合しやすいために高濃度化が極めて困難であるという特有の課題がある。

[0009] また、Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764(非特許文献3)およびJournal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23(非特許文献5)で、IgMは低塩濃度下で沈殿し、リン酸緩衝液あるいはトリス塩酸緩衝液の弱アルカリ性緩衝液かつ高塩濃度下で再溶解することが報告されている。Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764(非特許文献3)においては、pH 5付近ではIgMは沈殿しやすく取扱が困難なことが述べられ、弱酸性側の緩衝液においてIgM溶液に対しては悲観的であることが示唆されており、したがって、IgMの高濃度溶液を医薬品あるいはその原薬として提供でき

る可能性については何ら示されていない。また、本文献では、IgMを高濃度で含有するヒト血清を水で希釈するとeuglobulin沈殿として不溶性の凝集体が生じて濁度が上昇するが、NaCl、Arginine等の添加により塩濃度を上げるとeuglobulin沈殿が再溶解することが報告されている。しかし、本文献はeuglobulin沈殿の再溶解に関するものであり、IgMの水溶性会合体の増加抑制に関しては何ら開示されていない。さらに、本文献では患者血清を精製せずに用いており種々の血清タンパク質が存在するため、生じる不溶性の凝集体にはIgM以外のタンパク質が含まれる可能性があり、他のタンパク質非存在下でのIgM溶液に対する効果については示されていない。

[0010] Journal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23 (非特許文献5)では、euglobulin沈殿の再溶解に0.1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8の緩衝液が用いられているが、IgMの回収率は抗体あるいはバッチによって40 % から >90 % の範囲であり再現性が低いと記述されている。また、方法の項で4℃および -20℃において5-10 mg/mLの精製抗体を保存したことが記述されているが、結果の項では-20℃において数ヶ月間、機能低下なく保存できたことのみ記述されており、通常、安定性の確保が困難な4℃あるいはそれ以上の保存温度については何ら記載されていない。したがって、本文献では、IgMの高濃度溶液を医薬品あるいはその原薬として提供するためには、沈殿再溶解の再現性の困難さと保存安定性の確保の困難さが示されている。

[0011] また、BIOTECHNOLOGY 1993, 11, 512-515 (非特許文献4) および Journal of Immunological Methods, 111 (1988) 17-23 (非特許文献5) においても、euglobulin沈殿である抗体の不溶性凝集体の再溶解について記載されているが、その溶解度は10mg/mL以下であり、IgMの溶解度は低い。また、水溶性の会合体の安定化については何ら記載されていない。

[0012] さらに、Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632 (非特許文献6) においては、PVP添加によるIgMの安定化が開示されているが、高濃度の抗体の安定化ではなく、また、Journal of Immunological Methods 1995, 181(1), 37-43. (非特許文献7) においては、トレハロース添加による凍結乾燥製剤が開示されているが、抗体の安定性不十分であり、高濃度の抗体の安定化に関する記載はない。

特許文献1:WO2002/096457

非特許文献1:Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, (1984)81:6851)

非特許文献2:Nature (1986)321:521)

非特許文献3:Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(8):759-764

非特許文献4:BIOTECHNOLOGY 1993, 11, 512-515

非特許文献5:Journal of Immunological Methods, 111 (1988), 17-23

非特許文献6:Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632

非特許文献7:Journal of Immunological Methods 1995, 181, 37-43

非特許文献8:Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、高濃度のIgMを溶液中にて安定化させることにある。より詳しくは、本発明は、高濃度のIgMを安定化する方法、高濃度のIgMが安定化された溶液およびその製法を提供することを目的とする。

[0014] 高濃度のIgMが安定化された溶液の好ましい態様においては、水溶性の会合体増加が抑制されている水溶液を提供する。他の好ましい態様においては、医薬品としての使用に耐えうる安定性を有するIgM高濃度製剤を提供する。

### 課題を解決するための手段

[0015] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、塩化マグネシウムや塩酸アルギニン等の多価カチオン性のイオンを含む化合物を添加物として用いることによって、溶液におけるIgMの会合化を抑制し、IgMの安定な高濃度溶液を調製しうることを見出した。

[0016] 即ち、本発明は、高濃度のIgMを安定化する方法、高濃度のIgMが安定化された溶液およびその製法に関し、より詳しくは、下記発明を提供するものである。

(1) 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液であって、免疫グロブリンがIgMである溶液。

(2) IgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(1)に記載の溶液。

- (3) 水性溶液である、(1)に記載の溶液。
- (4) 医薬品製剤である、(1)に記載の溶液。
- (5) 多価カチオン性イオンを含有する、(1)に記載の溶液。
- (6) 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有する、(5)に記載の溶液。
- 。
- (7) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(5)に記載の溶液。
- (8) さらに糖類を含有する、(5)に記載の溶液。
- (9) pHが5〜8である、(1)に記載の溶液。
- (10) IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(1)に記載の溶液。
- (11) IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(1)に記載の溶液。
- (12) (1)から(11)に記載の溶液を凍結又は凍結乾燥して得られる医薬品製剤。
- (13) 高濃度の免疫グロブリンを含有する溶液を安定化する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。
- (14) 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(13)に記載の方法。
- (15) 溶液が水性溶液である、(13)に記載の方法。
- (16) 溶液が医薬品製剤である、(13)に記載の方法。
- (17) 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、(13)に記載の方法。
- (18) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(13)に記載の方法。
- (19) さらに糖類を添加する、(13)に記載の方法。
- (20) 溶液のpHが5〜8である、(13)に記載の方法。
- (21) 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(13)に記載の方法。
- (22) 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(13)に記載の方法。
- (23) (a) (13)から(22)のいずれかの方法を実施する工程、  
(b) 工程(a)により安定化された溶液を凍結又は凍結乾燥する工程を含む、医

薬品製剤の安定化方法。

(24) 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液を製造する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。

(25) 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、(24)に記載の方法。

(26) 溶液が水性溶液である、(24)に記載の方法。

(27) 溶液が医薬品製剤である、(24)に記載の方法。

(28) 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、(24)に記載の方法。

(29) 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、(24)に記載の方法。

(30) さらに糖類を添加する、(24)に記載の方法。

(31) 溶液のpHが5〜8である、(24)に記載の方法。

(32) 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、(24)に記載の方法。

(33) 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、(24)に記載の方法。

(34) (24)から(33)のいずれかの方法により製造された溶液。

(35) (a) (24)から(33)のいずれかの方法を実施する工程、

(b) 工程(a)により製造された溶液を凍結又は凍結乾燥する工程を含む、医薬品製剤の製造方法。

#### 図面の簡単な説明

[0017] [図1]各サンプルにおける25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月の会合体含有率から初期状態における会合体含有率を差し引いた値を $\Delta$  aggregateとして示す図である。

[図2]各サンプルの初期状態、4℃-3ヶ月における会合体含有率を示す図である。

[図3]各サンプルの初期状態、4℃-4ヶ月、25℃-4ヶ月における会合体含有率を示す図である。

[図4]各サンプルの初期状態、液体/40℃-8日、液体/40℃-8日+4℃-3日、凍結乾燥/40℃-8日、凍結乾燥/40℃-8日+4℃-3日、凍結乾燥/40℃-8日+4℃-3日+再凍結乾燥/50℃-8日におけるSEC会合体含有率%を示す図である。

[図5]各サンプルの初期状態、凍結乾燥/40℃-2ヶ月におけるSEC会合体含有率%を示す図である。

[図6]MABON-01のGPC-MALLS分析により得られたクロマトグラムおよび算出された分子量を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0018] 本発明において「IgM」とはH鎖の定常領域として $\mu$ 鎖の定常領域を有し、かつ5量体または6量体の構造を持つイムノグロブリンを言う。一方、本発明におけるIgMを構成する可変領域の由来は限定されない。したがって、 $\mu$ 鎖由来の可変領域に加えて、IgG由来の可変領域やその部分構造を含むことができる。可変領域の部分構造としては、フレームワークやCDRを示すことができる。なお本発明におけるIgMは、形質転換細胞に導入された外来性のIgM遺伝子の発現産物を言う。

[0019] さらに、本発明のIgMを構成する定常領域が由来する動物種も限定されない。つまり本発明のIgMは、IgMタイプのイムノグロブリンを有するあらゆる動物種に由来するIgM定常領域を含む。IgMを体内への投与に用いる場合には、少なくともその定常領域は、投与対象となる種と同じ種に由来することが望ましい。したがって、ヒトへの投与を目的とする場合には、少なくとも定常領域がヒト由来であることが望ましい。ヒト由来の定常領域と、他の動物種、あるいはヒト由来であるが他の個体に由来する可変領域とで構成されるIgMは、キメラ抗体と呼ばれる。定常領域に加えて、可変領域のフレームワークもヒト由来としたIgMは、ヒトへの投与用のIgMとして更に好ましいIgMである。可変領域のフレームワークの構造を維持し、CDRのみを他の動物種の抗体と組み換えられた抗体は、ヒト化抗体と呼ばれている。

[0020] 本発明において「高濃度の免疫グロブリン(IgM)」とは、溶液中のIgMの含有量が1mg/mLより高濃度であることを意味する。本発明の溶液は、IgMの含量が1mg/mL〜200mg/mLであることが好ましい。本発明によれば、10mg/mLより高濃度(例えば、20mg/mL以上、25mg/mL以上、40mg/mL以上、50mg/mL以上)であっても、IgMの安定化を図ることができる。

[0021] 本発明において、水溶性会合体の増加を抑制する場合は、多価カチオン性イオンを添加することが好ましい。本発明において使用できる「多価カチオン性イオン」は、2



価以上のカチオン性イオンであり、例えば、 $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Zn^{++}$ 、 $Fe^{++}$ 、塩基性アミノ酸等を使用することができる。塩基性アミノ酸としては、例えば、Arginine、Lysine、L-リジンL-グルタミン酸塩(L-Lysine L-Glutamate)、L-アルギニンL-グルタミン酸塩(L-Arginine L-Glutamate)等を使用することができる。好ましい多価カチオン性イオンとしては、 $Mg^{++}$ 又はArginineが挙げられる。本発明において使用できる「多価カチオン性イオン」を除くカチオン性イオンとしては、1価のカチオン性イオンであり、例えば $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ が挙げられる。

[0022] 溶液に添加されるカチオン性イオンあるいは多価カチオン性イオンの濃度は、通常、1mM〜1000mMであり、好ましくは10mM〜500mMであり、さらに好ましくは50mM〜200mMである。

[0023] 本発明の溶液は、カチオン性イオンあるいは多価カチオン性イオンに加えて、糖類を含有してもよい。好ましい糖類としては、トレハロース、スクロース、ソルビトールを挙げることができる。

[0024] 本発明において使用できる緩衝液種としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液が挙げられる。

[0025] 本発明における「安定化」とは、保存中に生じる水溶性のIgM会合体の増加を抑制すること、及び／又は、保存中に生じる不溶性のIgM会合体(沈殿物)の増加を抑制すること及び／又は、水溶性のIgMの機能を保持していることをいい、好ましくは、保存中に生じる水溶性のIgM会合体の増加を抑制することをいう。

[0026] 本発明における「水溶性の会合体」とは、IgMの2量体、3量体などの多量体で水溶性のものをいう。水溶性の会合体は、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーで検出することができる。IgM高濃度溶液の安定化は、例えば、次の式により求まる会合体増加抑制率により測定することができる。

$$\text{会合体増加抑制率} = (A - B) / A \times 100$$

A: 多価カチオン性イオンを添加しないIgM高濃度溶液(コントロール)の会合体増加率

B: 多価カチオン性イオンを添加したIgM高濃度溶液(被験試料)の会合体増加率

[0027] 本発明の溶液は、高濃度のIgMを含有する溶液に多価カチオン性イオンを添加し

てから1ヶ月後の会合体増加抑制率が、好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上、更に好ましくは80%以上のものである。

[0028] 本発明の溶液は、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を含有しない溶液であることが好ましい。さらに好ましくは、IgM以外のタンパク質であって、安定化剤としての効果を示し得る量以上のタンパク質を含有しない溶液である。本願の溶液が医薬品製剤である場合は、IgM以外のヒト由来のタンパク質であって、医薬品の原薬及び／又は医薬品として許容される量以上のタンパク質を含有しない溶液であることが好ましい。

[0029] 本発明の医薬品製剤の剤形に特に限定はなく、任意の剤形とすることが可能である。剤形としては、例えば、溶液製剤、凍結乾燥製剤を挙げることができる。また、溶液製剤としては、冷所保存製剤、常温保存製剤、凍結製剤などが挙げられる。また、本発明の医薬品製剤の投与ルートにも限定はなく、任意の投与ルートを用いることが可能である。したがって、医薬品製剤の使用目的に応じて、経口、非経口投与のいずれでもありうる。

[0030] 非経口投与のための具体的な剤型として、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などを示すことができる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局所的に投与することができる。

[0031] 本発明の方法により、安定化したIgMは、それ自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した薬剤として投与することもできる。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように調節することができる。

[0032] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブ

ドウ糖やその他の補助剤を含む等張液などが利用される。補助剤には、具体的には、例えば、スクロース、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等を利用することができる。医薬組成物には、適当な溶解補助剤を加えることもできる。例えばアルコールや非イオン性界面活性剤は、溶解補助剤として好ましい。アルコールとしては、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を示すことができる。また非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー188、あるいはHCO-50などを用いることができる。また、塩化ベンザルコニウム等の陽イオン性界面活性剤も使用できる。

[0033] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なバイアルあるいはアンプルに充填される。

[0034] 本発明の溶液を医薬品製剤とする場合は、pH5〜8であることが好ましく、特に好ましくはpH5〜7である。

[0035] 医薬品製剤は、対象疾患、患者の年齢、症状により適宜投与量を選択することができる。例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001〜100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の医薬品製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。その他、本発明の溶液製剤等の調製に関しては、WO2002/096457を参照のこと。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0036] 以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

### [実施例1]

以下の実施例では、IgMとして、参考例1で作製した組換え型抗ガングリオンドGM3ヒト抗体(以下、「MABON-01」という)を使用した。MABON-01溶液を濃縮し、約9 mg/mLの高濃度溶液を調製した。これを透析膜SLIDE-A-LYZER Dialysis Cassette 10000MWCO (PIERCE)により透析を行い、以下の1.~6.の緩衝液に透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20mM酢酸ナトリウム、300mM NaCl、pH5.0 / 酢酸塩pH5.01.
2. 20mM酢酸ナトリウム、300mM NaCl、pH5.5 / 酢酸塩pH5.52.
3. 20mM酢酸ナトリウム、300mM NaCl、pH6.0 / 酢酸塩pH6.03.
4. 20mMクエン酸ナトリウム、300mM NaCl、pH5.0 / クエン酸塩pH5.04.
5. 20mMクエン酸ナトリウム、300mM NaCl、pH5.5 / クエン酸塩pH5.55.
6. 20mMクエン酸ナトリウム、300mM NaCl、pH6.0 / クエン酸塩pH6.01.

[0037] 得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を8.4 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph.(SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を4℃で実施した。サンプルは初期状態、4℃-2ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる単量体残存率の変化により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSOH)を用いた。50 mM リン酸ナトリウム、500 mM KCl、pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の単量体残存率を算出した。各サンプルの初期状態における単量体残存率を100%とし、4℃-2ヶ月の単量体残存率を表1に示した。

[0038] [表1]

pH	残存率 %	
	酢酸塩	クエン酸塩
5.0	99.33	99.16
5.5	99.51	99.3
6.0	98.92	98.9

[0039] これより、300mM NaClを含むpH5.0~pH6.0のクエン酸あるいは酢酸緩衝液において、安定な高濃度MABON-01溶液を調製することができた。

[0040] 以下の実施例において、クエン酸緩衝液を用いたpH5.5の溶液に多価カチオンを

添加することでさらに水溶性の会合体の増加を抑制し安定化した高濃度MABON-01溶液を示す。

[0041] [実施例2]

MABON-01溶液を濃縮し、約18 mg/mLの高濃度溶液を調製した。これを透析膜 SLIDE-A-LYZER Dialysis Cassette 10000MWCO (PIERCE)により透析を行い、20 mM クエン酸, 300 mM NaCl, pH 5.5の溶液に緩衝液置換を行った(添加物なしの状態では、緩衝液種、pHを最適化してある)。この高濃度MABON-01溶液を以下の1.~9.の緩衝液に透析EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, pH5.5 / なし
2. 20 mM クエン酸ナトリウム, 900 mM NaCl, pH5.5 / NaCl
3. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 200 mM  $MgCl_2$ , pH5.5 /  $MgCl_2$
4. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 200 mM  $Na_2SO_4$ , pH5.5 /  $Na_2SO_4$
5. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100 mM L-グルタミン酸ナトリウム塩, pH 5.5 / L-グルタミン酸ナトリウム塩
6. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100 mM L-アルギニン塩酸塩, pH 5.5 / L-アルギニン塩酸塩
7. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100 mM N-アセチルトリプトファンナトリウム塩, pH5.5 / N-アセチルトリプトファンナトリウム塩
8. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 10mM 尿素, pH 5.5 / 尿素
9. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100mM トレハロース, pH 5.5 / トレハロース

[0042] 得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を18.5 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph.(SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を25℃で実施した。サンプルは初期状態、25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化(増加)により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSOH)を用いた。50 mM リン酸ナトリウム, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体

ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルの25℃-1ヶ月、及び、25℃-2ヶ月の会合体含有率から初期状態における会合体含有率を差し引いた値を $\Delta$  aggregateとして、図1に示した。

[0043] その結果、1. なし(300mM NaClを含む)に比べて、2. NaCl(900mM NaClを含む)は会合体の増加が抑制された。これより、NaCl濃度を高くすることによって、会合体の増加を抑制できることが分かった。

[0044] 一方、2. NaCl(900mM NaClを含む)、3.  $\text{MgCl}_2$  (300mM NaCl+200mM  $\text{MgCl}_2$ を含む)、4.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (300mM NaCl+200mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を含む)において、これらは同じイオン強度(いずれもイオン強度0.9M)であるにも関わらず、2価のカチオンを含む $\text{MgCl}_2$ は著しい安定化効果が認められ、2価のアニオンを含む4.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ の安定化効果は2. NaClと同程度であった。

[0045] また、同じイオン性のアミノ酸であるL-グルタミン酸ナトリウム塩を含む5. L-グルタミン酸ナトリウム塩では安定化効果が認められないにも関わらず、2価のカチオンであるL-アルギニン塩酸塩を含む6. L-アルギニン塩酸塩では、3.  $\text{MgCl}_2$ と同等の安定化効果が認められた。

[0046] このような結果から、NaCl等の塩を加えイオン強度を高くすることによって、会合体を抑制できることが分かった。さらに、同じイオン強度においても、2価のカチオンであるマグネシウムイオンやアルギニンを用いることによってさらに高い会合体抑制効果が得られることが分かった。一方、2価のアニオンである硫酸イオンやグルタミン酸では高い会合体抑制効果が得られない。すなわち、マグネシウムイオンやアルギニン等の2価のカチオンがMABON-01と相互作用することで、MABON-01の会合化を著しく抑制し、安定な高濃度溶液を調製することが出来た。

[0047] [実施例3]

MABON-01溶液を濃縮し、約19 mg/mLのMABON-01高濃度溶液を調製した。これを以下の1.-9.の緩衝液に透析膜EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, pH5.51.

2. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH5.52.

3. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH5.53.
4. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 200 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH5.54.
5. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 200 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM トレハロース, pH5.55.
6. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 10 mM L-アルギニン塩酸塩, pH5.56.
7. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 50 mM L-アルギニン塩酸塩, pH5.57.
8. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100 mM L-アルギニン塩酸塩, pH5.58.
9. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100 mM L-アルギニン塩酸塩, 100mM トレハロース, pH 5.5

[0048] 得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を18.9 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph.(SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を実施した。サンプルは初期状態、4°C-3ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化(増加)により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSOH)を用いた。50 mM リン酸ナトリウム, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルの初期状態、4°C-3ヶ月における会合体含有率を図2に示した。

[0049] その結果、 $\text{MgCl}_2$ とL-アルギニン塩酸塩の濃度依存的に会合体抑制効果が見られた。すなわち、 $\text{MgCl}_2$ とL-アルギニン塩酸塩の濃度を高くすることによって、大きな安定化効果が得られた。さらに、トレハロース単独では安定化効果がないものの(実施例2及び実施例4)200 mM  $\text{MgCl}_2$ あるいは100 mM L-アルギニン塩酸塩存在下に100 mM trehaloseを添加することによって、安定化効果が得られた。

[0050] [実施例4]

MABON-01溶液を濃縮し、より高濃度の約27 mg/mLのMABON-01高濃度溶液を調製した。これを以下の1.-3.の緩衝液に透析膜EasySep (TOMY)を用いて透析し、緩衝液置換を行った。

1. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, pH5.5 / なし

2. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 200 mM  $MgCl_2$ , pH5.5 /  $MgCl_2$
3. 20 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, 100mM トレハロース, pH 5.5 / トレハロース

[0051] 得られた溶液を回収し、各サンプルのMABON-01の濃度を26.8 mg/mLに統一し、保存容器Multiply-Safecup 0.1ml Biosph.(SARSTEDT)に充填した。これらのサンプルの安定性試験を実施した。サンプルは初期状態、4℃-4ヶ月および25℃-4ヶ月で評価した。サンプルの安定性は、ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含有率の変化(増加)により評価した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSO)を用いた。50 mM リン酸ナトリウム, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の値より、試料の会合体含有率を算出した。各サンプルの初期状態、4℃-4ヶ月および25℃-4ヶ月における会合体含有率を図3に示した。

[0052] その結果、4℃と25℃において、ともに $MgCl_2$ の安定化効果が認められた。一方、一般的なタンパク質の安定化剤として知られ、Journal of Immunological Methods 1995, 181(1), 37-43において凍結乾燥時のIgMの安定化効果が認められているtrehaloseに関しては、ほとんど効果が認められなかった(図3)。

[0053] [実施例5]

<準備>

「50 mM クエン酸ナトリウム, 180 mM NaCl, pH5.5, 5% スクロース」または「50 mM クエン酸ナトリウム, 180 mM ArgHCl, pH5.5, 5% スクロース」または「50 mM クエン酸ナトリウム, 180 mM  $MgCl_2$ , pH5.5, 5% スクロース」においてMABON-01の大規模な透析を行った。透析後、フィルター遠心法によって溶液を濃縮した。VIVASPIN6 5000MWCO (VIVASCIENCE, VS061)を用いて、himac CF8DL (Hitachi, No. SZGEQ054)により3000 rpmで遠心を行った。濃縮および回収後、UV吸光度( $\epsilon = 1.40$ )で濃度を測定した。次いで、緩衝液を用いてサンプルを48.4 mg/mLに希釈した。さらに1% ポリソルベート80溶液を加え、0.01% ポリソルベート製剤を得た。上記サンプルをそれぞれ500  $\mu$ Lずつ5 mL ガラスバイアルに充填し、それぞれ30  $\mu$ Lずつ Multiply-Safecup 0.1 ml Biosph. (SARSTEDT)に充填した。下記の条件において、5



mL ガラスバイアルを凍結乾燥した。初期サンプルとして1 mg/mL MABON-01を使用し、分析時まで4°Cで保管した。

[0054] [表2]

温度[°C]	時間[hr]
-50	24
-20	0.02
-20	18
23	2.5
23	28
30	0.25
30	10
合計	82.77

[0055] <実験の条件>

”50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM NaCl、pH5.5、5% スクロース、0.01% ポリソルベート80”

”50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM ArgHCl、pH5.5、5% スクロース、0.01% ポリソルベート80”

”50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM MgCl<sub>2</sub>、pH5.5、5% スクロース、0.01% ポリソルベート80”

MABON-01 : 48.4 mg/mL

溶液/40°C-8日

溶液/40°C-8日+4°C-3日

凍結乾燥/40°C-8日

凍結乾燥/40°C-8日+4°C-3日(再溶解後)

凍結乾燥/40°C-8日+4°C-3日(再溶解後)+再凍結乾燥/50°C-8日

[0056] <分析>

インキュベーション後、希釈溶液(1/50希釈溶液:4+296  $\mu$ L)から1mg/mLを用いてSEC によって10  $\mu$ Lを分析した。「50 mM クエン酸ナトリウム、500 mM KCl、pH7.4」

を移動相(流量0.3 ml/分、280 nmまたは220 nmで検出)として使用し、G4000SWxl (TOSOH) によってSEC分析を行った(図4)。

同濃度のNaClに比べて、ArgHClおよびMgCl<sub>2</sub>は、50℃でインキュベーションされている間も、凍結乾燥の安定化効果が高かった。

[0057] [実施例6]

〈準備〉

「50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM NaCl、pH5.5、5% スクロース」または「50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM ArgHCl、pH5.5、5% スクロース」においてMABON-01の大規模な透析を行った。透析後、フィルター遠心法によって溶液を濃縮した。

VIVASPIN6 5000MWCO (VIVASCIENCE, VS061)を用いて、himac CF8DL (Hitachi、No. SZGEQ054)により3000 rpmで遠心を行った。濃縮および回収後、UV吸光度( $\epsilon = 1.40$ )で濃度を測定した。さらに、1% ポリソルベート80溶液を加え、0.01% ポリソルベート製剤を得た。また、サンプルを希釈し、50 mg/mL製剤を得た。上記のサンプルをそれぞれ300  $\mu$ L、3本の5 mL ガラスバイアルに充填した。下記の条件において5 mL ガラスバイアルを凍結乾燥した。凍結乾燥製剤は初期サンプルとして、分析時まで4℃で保管した。

[0058] [表3]

温度[℃]	時間 [hr]
-50	24
-20	0.02
-20	18
23	2.5
23	28
30	0.25
30	10
合計	82.77

[0059] 〈実験の条件〉

「50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM NaCl、pH5.5、5% スクロース、0.01% ポリソルベ

ート80"

"50 mM クエン酸ナトリウム、180 mM ArgHCl、pH5.5、5% スクロース、0.01% ポリソルベート80"

MABON-01 : 50mg/mL

凍結乾燥/40℃-2ヶ月

[0060] <分析>

インキュベーション後、希釈溶液(1/50希釈溶液:4+296  $\mu$ L)から1mg/mL を用いてSEC によって10  $\mu$ Lを分析した。「50 mMクエン酸ナトリウム、500 mM KCl、pH7.4」を移動相(流量0.3 ml/分、280 nmまたは220 nmで検出)として使用し、G4000SWxl(TOSOH)によってSEC分析を行った(図5)。

40℃-2ヶ月の長期加速試験でも、同濃度のNaClに比べて、ArgHClは高い安定化効果を示した。

[0061] [参考例1]ガングリオシドGM3に対する組換え型ヒト抗体の作製

1.1 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の構築

ガングリオシドGM3に結合するヒト抗体のH鎖をコードする遺伝子は、Epstein-Barrウイルスで形質転換されたヒトB細胞(以下、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞と表記する)より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。

[0062] Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits(QIAGEN社製)を用いて $1 \times 10^7$ 細胞の抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列(Cancer Research 1993;53:5244-5250)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(LMH-r3、LMH-r3)を設計した。LMH-r3(配列番号:7)はセンス方向で、LMH-r3(配列番号:8)はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。1  $\mu$ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit(CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-r3を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-r3を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分開反応させた。

[0063] PCR反応溶液(50  $\mu$ L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10 $\times$  Advantage 2 PCR Buffer、  
5  $\mu$  Lの10 $\times$  Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1  $\mu$  Lの Advantage 2 Polymerase Mix、  
(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)  
2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、  
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-f3またはLMH-r3  
また反応温度条件は次のとおりである。  
94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて30秒間、  
94 $^{\circ}$ C/5秒間、72 $^{\circ}$ C/3分間のサイクルを5回  
94 $^{\circ}$ C/5秒間、70 $^{\circ}$ C/10秒間、72 $^{\circ}$ C/3分間のサイクルを5回反復  
94 $^{\circ}$ C/5秒間、68 $^{\circ}$ C/10秒間、72 $^{\circ}$ C/3分間のサイクルを25回反復  
最後に反応産物を72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

[0064] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製)及びSacII (宝酒造社製)で消化して得られる約1.1kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製)及びNotI (宝酒造社製)で消化して得られる約1.1kbpの断片を混合し、pBluescript KS+ベクター (東洋紡社製)へクローニングし、完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を得た。

[0065] 動物細胞発現用ベクターへクローニングするために、合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsalを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LMH-fxho (配列番号:11)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつXhoI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLMH-rsal (配列番号:12)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、SalI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

[0066] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10 $\times$ PCR Buffer、  
1mM MgSO<sub>4</sub>、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-  
(以上の成分はいずれも東洋紡社製)、  
10ngの完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を含むpBluescript KS+  
ベクター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMIH-fxho、LMIH-rsal

また反応温度条件は次のとおりである。

94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて2分間、

94 $^{\circ}$ C/15秒間、60 $^{\circ}$ C/30秒間、68 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

[0067] 増幅した遺伝子断片は、制限酵素XhoI (宝酒造社製) および制限酵素SalI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、pUCAGの制限酵素XhoI部位に連結し、クローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN (Niwaら、Gene 1991; 108: 193-200) を制限酵素BamHIで消化して得られる2.6kbpの断片をpUC19ベクター (東洋紡社製) の制限酵素BamHI部位に連結し、クローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpUCAG/L612Hと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号: 1及び配列番号: 2に示す。

[0068] 1.2 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のL鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列 (Cancer Research 1993; 53: 5244-5250) に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド (LML-rf1、LML-rf1) を設計した。LML-rf1 (配列番号: 9) はセンス方向で、LML-rf1 (配列番号: 10) はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。

- [0069] 1  $\mu$ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-f1を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。
- [0070] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。
- 5  $\mu$  Lの10×Advantage 2 PCR Buffer、  
5  $\mu$  Lの10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1  $\mu$  LのAdvantage 2 Polymerase Mix  
(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)  
2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、  
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-f1またはLML-r1  
また反応温度条件は次のとおりである。
- 94℃の初期温度にて30秒間、  
94℃/5秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復  
94℃/5秒間、70℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復、  
94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復  
最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。
- [0071] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.7kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.9kbpの断片を混合し、合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnotを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LML-feco (配列番号:13)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLML-rnot (配列番号:14)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体

L鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、NotI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

[0072] PCR反応溶液(50  $\mu$ L)の組成を次に示す。

5  $\mu$ Lの10×PCR Buffer、

1mM  $MgSO_4$ 、

0.2mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnot

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

[0073] 増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素NotI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、pCXND3の制限酵素EcoRIおよびNotI切断部位に連結し、クローニングした。

[0074] 本ベクターpCXND3の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR- $\Delta$ E-rvH-PM1-f(WO92/19759参照)の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI/SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor(宝酒造社製)をクローニングした。このベクターをpCHOIと命名した。

[0075] pCHOIのDHFR遺伝子発現部位をpCXN(Niwaら、Gene 1991;108:193-200)の制限酵素HindIII部位にクローニングしたベクターをpCXND3と命名した。また、L鎖遺伝子断片をpCXND3にクローニングし、完成したプラスミドをpCXND3/L612Lと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号:3および配列番号:4に示す。

[0076] 1.3 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターを作製するために、pUCAG/L612Hを制限酵素HindIII(宝酒造社製)で消化して得られる約4.0kbpの断片をpCXND3/L612Lの制限酵素HindIII切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドをpCXND3/L612lgMと命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子を発現する。

[0077] 1.4 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子および発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のJ鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。GenBankに登録されているヒト抗体J鎖遺伝子の塩基配列(GenBank番号:M12759)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(J-f1、J-r1)を設計し、合成した。J-f1(配列番号:15)はセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon3にハイブリダイズし、J-r1(配列番号:16)はアンチセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon4にハイブリダイズする。

[0078] 1  $\mu$ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-f1を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

[0079] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×Advantage 2 PCR Buffer、  
5  $\mu$  Lの10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1  $\mu$  LのAdvantage 2 Polymerase Mix  
(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)  
2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、  
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-f1またはJ-r1



また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間

94℃/5秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復

94℃/5秒間、70℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復

94℃/5秒間、68℃/10秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。

[0080] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。

[0081] 塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.5kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約1.0kbpの断片を混合し合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxbaを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。

[0082] J-feco (配列番号:17)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またJ-rxba (配列番号:18)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、XbaI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

[0083] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxba

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94°C/15秒間、60°C/30秒間、68°C/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72°Cで5分間加熱した。

[0084] 増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素XbaI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pCOSII-Zeoの制限酵素EcoRIおよびXbaI切断部位に連結し、クローニングした。

[0085] 本ベクターpCOSII-Zeoは、上述のpCHOIのDHFR遺伝子発現部位を除去し、Zeocin耐性遺伝子発現部位をクローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpCOSII-Zeo/J chainと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号:5および配列番号:6に示す。

[0086] 1.5 動物細胞を用いた抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現

CHO細胞(DG44株)を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。

Gene PulserII(BioRad社製)を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。

[0087] J鎖を発現しない細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM(25  $\mu$ g)とPBSに懸濁したCHO細胞( $1 \times 10^7$ 細胞/ml)の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25  $\mu$ FDの容量にてパルスを与えた。

[0088] 室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement(Invitrogen社製)を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen社製)40mLに懸濁した。同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)で24時間培養後、Geneticin(Invitrogen社製)を0.5mg/mLになるように添加して2週間培養した。

[0089] Geneticin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgM量について参考例1.6に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株CA02、CA15、CA19、CA20、およびCA24を得た。

[0090] また、J鎖を発現する細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM(25  $\mu$ g)およびJ鎖発現ベクター

pCOSH-Zeo/J chain (20  $\mu$ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) の 0.75ml を混合したものを氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25  $\mu$ FD の容量にてパルスを与えた。

[0091] 室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement (Invitrogen 社製) を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地 (Invitrogen 社製) 40mL に懸濁した。

[0092] 同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) で 24 時間培養後、0.5mg/mL 濃度の Geneticin (Invitrogen 社製) および 0.6mg/mL 濃度の Zeocin (Invitrogen 社製) を添加して 2 週間培養した。Geneticin、Zeocin 耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中の IgM 量について参考例 1.6 に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシド GM3 ヒト抗体安定発現細胞株 (CJ15、CJ25、CJ38、CJ45、CJ67) を得た。

[0093] 1.6 培養上清中の IgM 濃度の測定

培養上清中の IgM 濃度の測定は以下のように行った。Anti-Human IgM (BIOSORCE 社製) を 1  $\mu$ g/ml になるように Coating Buffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.02% NaN<sub>3</sub>) で希釈し、96 ウェル ELISA 用プレートに 100  $\mu$ l/ウェルで加え、4℃ で 24 時間以上反応させ、コーティングを行った。

[0094] さらに、Rinse Buffer で洗浄した後に、200  $\mu$ l/ウェルの Diluent Buffer を加え、室温で 1 時間以上反応させ、ブロッキングした。Rinse Buffer および Diluent Buffer の組成はそれぞれ次のとおりである。

Rinse Buffer:

PBS(-)、

0.05% Tween20

Diluent Buffer:

50mM Tris、

1mM MgCl<sub>2</sub>、

0.15M NaCl、

0.05% Tween20、

0.02%  $\text{NaN}_3$ 、

1% BSA

[0095] その後、Diluent Bufferで適当に希釈した培養上清を100  $\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Rinse Bufferで洗浄した後に、Goat Anti-Human IgM、Alkaline Phosphatase conjugated (BIOSORCE社製)をDiluent Bufferで4000倍に希釈し、100  $\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。最後にRinse Bufferで洗浄した後にアルカリフォスファターゼ基質 (SIGMA社製)を加え、吸光光度計Benchmark Plus (BioRad社製)を用いて、測定波長405nm、対照波長655nmの吸光度を測定した。IgM濃度は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体精製品 (Hoonら、Cancer Research 1993;53:5244-5250)との比較で算出した。

[0096] 各種抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株を75cm<sup>2</sup>培養フラスコ内で初発細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mLで培養し、培養上清中のIgM濃度を上記の方法で測定した。結果を表4に示す。IgM産生量は培養3日目で約20mg/L、培養7日目で約50mg/Lであり、単一細胞が産生する能力を示す産生能は5-19pg/cell/dayであった。IgMはイムノグロブリンの中でも多量体を形成するために、組換え体は発現量が低く、大量に調製することが困難であるとされていたが、今回の結果より、CHO細胞において高い産生量の組換え型IgM発現細胞が作製できることが明らかになった。

[0097] [表4]

J鎖発現	細胞株	培養3日間の 産生量 (mg/L)	培養7日間の 産生量 (mg/L)	産生能 (pg/cell/day)
無し	CA02	24.1	36.9	14.1
	CA15	11.8	39.7	4.9
	CA19	27.1	62.3	13.1
	CA20	20.2	35.4	10.5
	CA24	25.0	41.5	10.7
有り	CJ15	29.4	N.T.	19.4
	CJ25	24.4	N.T.	18.1
	CJ38	14.9	N.T.	12.4
	CJ45	26.4	N.T.	18.7
	CJ67	18.0	N.T.	12.8

N.T.: Not Tested

[0098] [参考例2] 会合体の測定(1)

以下の緩衝液を移動相として用いて、MABON-01のゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。何れの分析でもカラムはTSKgel G4000SW<sub>XL</sub>を用い、流速は0.3 mL/min、検出は280nmにおける吸光度、試料注入量は10  $\mu$ gとした。

1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.21.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.52.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH6.83.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.14.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.45.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH6.56.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH7.47.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH6.58.
1. 50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH7.49.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH6.510.
1. 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH7.411.

[0099] 得られたクロマトグラムの会合体ピーク面積値と単量体ピーク面積値(ピークの帰属は別途行った)を表5に示す。

[0100] [表5]

	KCl				NaCl			
	500 mM		300 mM		500 mM		300 mM	
pH6.2	3073386		—		—		全ピーク面積値	
	146342	2927044	—	—	—	—	会合体	単量体
pH6.5	3096904		2959509		3044989		2818198	
	155304	2941600	124880	2834629	127467	2917522	82928	2735270
pH6.8	3074760		—		—		—	
	153682	2921078	—	—	—	—	—	—
pH7.1	3033846		—		—		—	
	154085	2879761	—	—	—	—	—	—
pH7.4	3074597		3098757		3130093		2948932	
	163747	2910850	157320	2941437	144630	2985463	112427	2836505

各セルの上段に全ピーク面積値、下段左に会合体面積値、下段右に単量体面積値を示した。

[0101] また、全ピーク面積値に対する会合体ピーク面積比率ならびに単量体ピーク面積比率を算出した結果を表6に示す。

[0102] [表6]

	KCl				NaCl			
	500 mM		300 mM		500 mM		300 mM	
pH6.2	4.8	95.2	—	—	—	—	会合体	単量体
pH6.5	5.0	95.0	4.2	95.8	4.2	95.8	2.9	97.1
pH6.8	5.0	95.0	—	—	—	—	—	—
pH7.1	5.1	94.9	—	—	—	—	—	—
pH7.4	5.3	94.7	5.1	94.9	4.6	95.4	3.8	96.2

各セルの左に会合体ピーク面積比率、単量体ピーク面積比率を示した。

[0103] これらの結果から、全ピーク面積値ならびに会合体ピーク面積比率、何れに関しても、pH6.2-7.1の移動相緩衝液を用いた分析に比べてpH7.4の移動相緩衝液を用いた時に塩種ならびに塩濃度の影響が抑えられ、またKCl、NaCl何れの塩を含む移動相緩衝液でも塩濃度が300 mMの移動相緩衝液に比べて500 mMの時にpHの影響が抑えられ、更にNaClを含む移動相緩衝液に比べてKClを含む移動相緩衝液を用

いた時に塩濃度もしくは移動相pHの影響が抑えられることがわかった。以上から、MABON-01のゲル濾過クロマトグラフィー分析の移動相条件を、50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.4と設定した。

[0104] [参考例3] 会合体の測定(2)

MABON-01のGPC-MALLS分析を行い、各ピークの分子量を測定した。移動相は50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH7.4の緩衝液を、カラムはTSKgel G4000SW<sub>XL</sub>を用いた。流速は0.3 mL/min、検出は280nmにおける吸光度、試料注入量は113  $\mu$ gとした。得られた結果からDebye法によって分子量を算出した。

[0105] 得られたクロマトグラムおよび算出された分子量を重ねて図6に示す。また、図中ピーク1ならびにピーク2の平均分子量と、MABON-01のアミノ酸配列から算出した理論分子量を表7に示す。

[0106] [表7]

平均分子量		理論分子量	
	M. W. [kDa]		M. W. [kDa]
ピーク 1	1, 109	単量体	1, 034
ピーク 2	2, 193	二量体	2, 068

[0107] 尚、ピーク2は21.5-22.0分、ピーク1は24.5-25.0分の分子量を平均し、平均分子量とした。ピーク1ならびにピーク2の平均分子量がそれぞれ単量体ならびに二量体の理論分子量に近いこと、またピーク2の平均分子量がピーク1の平均分子量の約2倍であることから、ピーク1にはMABON-01単量体が、ピーク2には二量体が含まれることがわかった。

### 産業上の利用の可能性

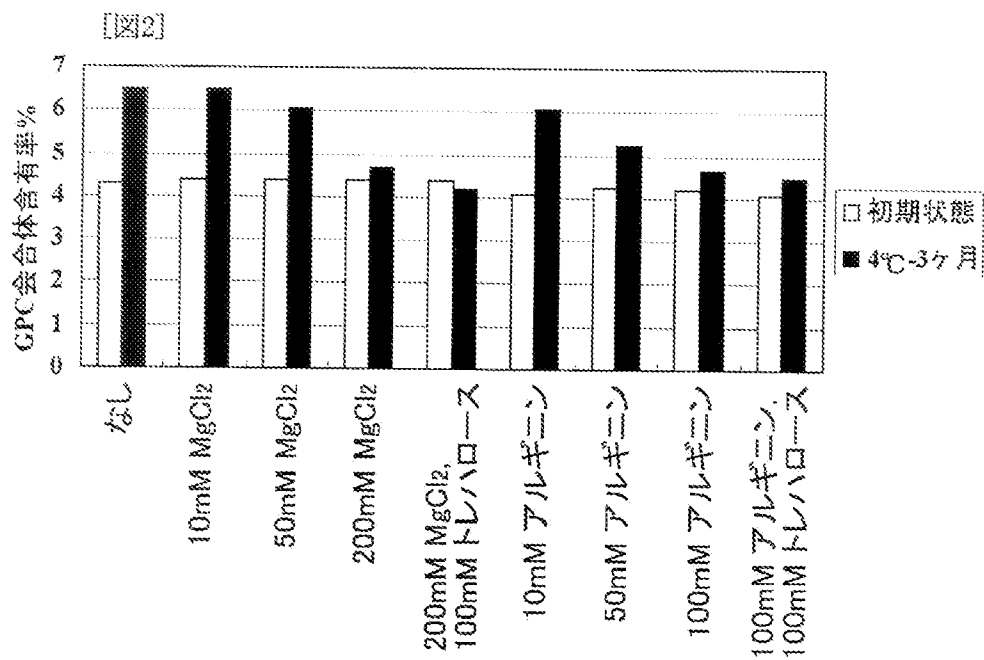
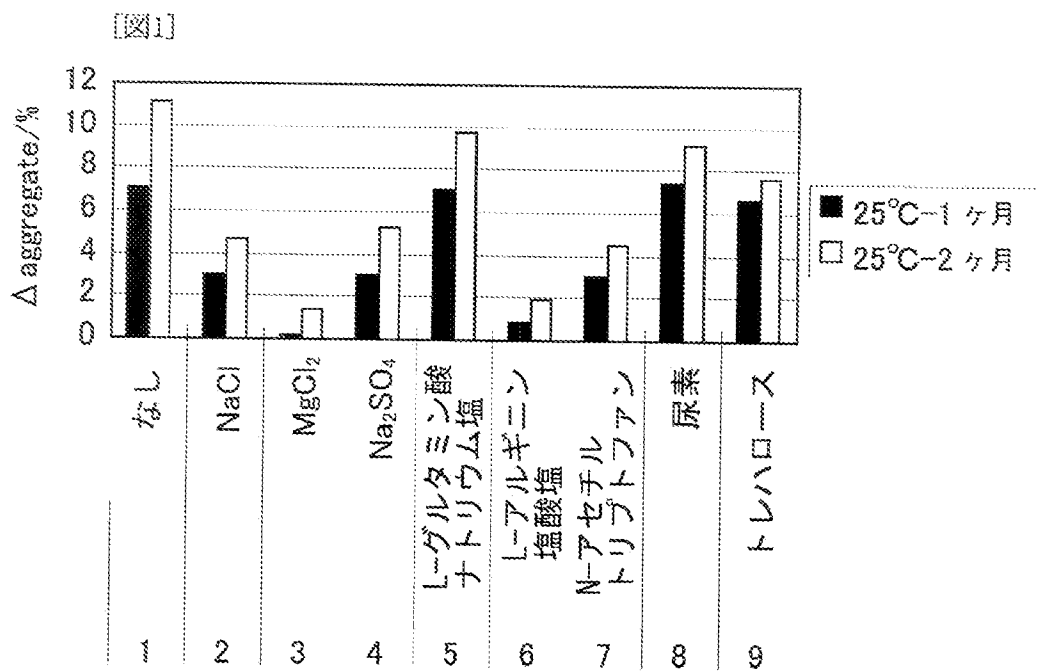
[0108] 本発明により、高濃度のIgMを溶液中にて安定化することが可能となった。本発明によれば、IgMを有効成分とする医薬製剤を長期間安定に保存することが可能であるため、本発明は特に抗体製剤の調製に大きく貢献しうるものである。

## 請求の範囲

- [1] 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液であって、免疫グロブリンがIgMである溶液。
- [2] IgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項1に記載の溶液。
- [3] 水性溶液である、請求項1に記載の溶液。
- [4] 医薬品製剤である、請求項1に記載の溶液。
- [5] 多価カチオン性イオンを含有する、請求項1に記載の溶液。
- [6] 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有する、請求項5に記載の溶液。
- [7] 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項5に記載の溶液。
- [8] さらに糖類を含有する、請求項5に記載の溶液。
- [9] pHが5〜8である、請求項1に記載の溶液。
- [10] IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項1に記載の溶液。
- [11] IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項1に記載の溶液。
- [12] 請求項1から11に記載の溶液を凍結又は凍結乾燥して得られる医薬品製剤。
- [13] 高濃度の免疫グロブリンを含有する溶液を安定化する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。
- [14] 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項13に記載の方法。
- [15] 溶液が水性溶液である、請求項13に記載の方法。
- [16] 溶液が医薬品製剤である、請求項13に記載の方法。
- [17] 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、請求項13に記載の方法。
- [18] 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項13に記載の方法。
- [19] さらに糖類を添加する、請求項13に記載の方法。
- [20] 溶液のpHが5〜8である、請求項13に記載の方法。
- [21] 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項13に記載の方法。



- [22] 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項13に記載の方法。
- [23] (a)請求項13から22のいずれかの方法を実施する工程、  
(b)工程(a)により安定化された溶液を凍結又は凍結乾燥する工程を含む、医薬品製剤の安定化方法。
- [24] 高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液を製造する方法であって、免疫グロブリンがIgMであり、溶液に多価カチオン性イオンを添加する方法。
- [25] 溶液がIgMを1mg/mLより高濃度で含有する、請求項24に記載の方法。
- [26] 溶液が水性溶液である、請求項24に記載の方法。
- [27] 溶液が医薬品製剤である、請求項24に記載の方法。
- [28] 多価カチオン性イオンを1mM〜1000mMの濃度で含有するように、溶液に多価カチオン性イオンを添加する、請求項24に記載の方法。
- [29] 多価カチオン性イオンが、Mgイオン又はArgイオンである、請求項24に記載の方法。
- [30] さらに糖類を添加する、請求項24に記載の方法。
- [31] 溶液のpHが5〜8である、請求項24に記載の方法。
- [32] 溶液が、IgM以外のヒト由来の他のタンパク質を本質的に含有しない、請求項24に記載の方法。
- [33] 溶液が、IgM以外のタンパク質を本質的に含有しない、請求項24に記載の方法。
- [34] 請求項24から33のいずれかの方法により製造された溶液。
- [35] (a)請求項24から33のいずれかの方法を実施する工程、  
(b)工程(a)により製造された溶液を凍結又は凍結乾燥する工程を含む、医薬品製剤の製造方法。



[図3]

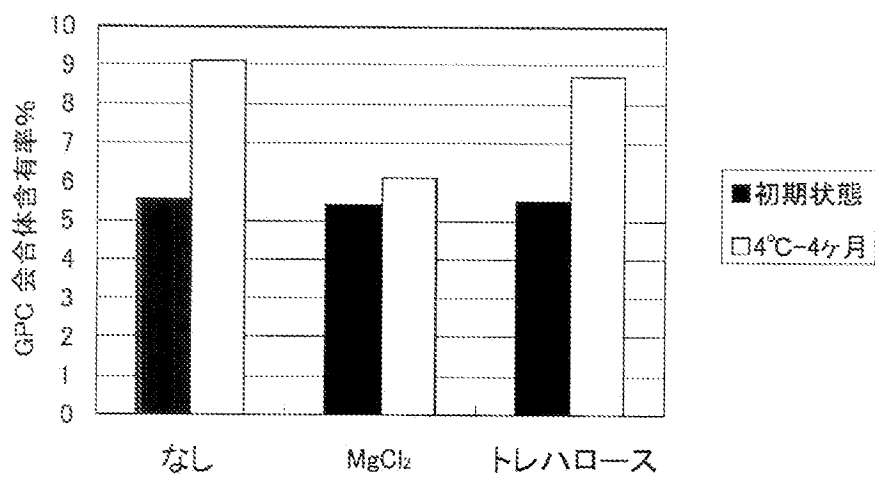
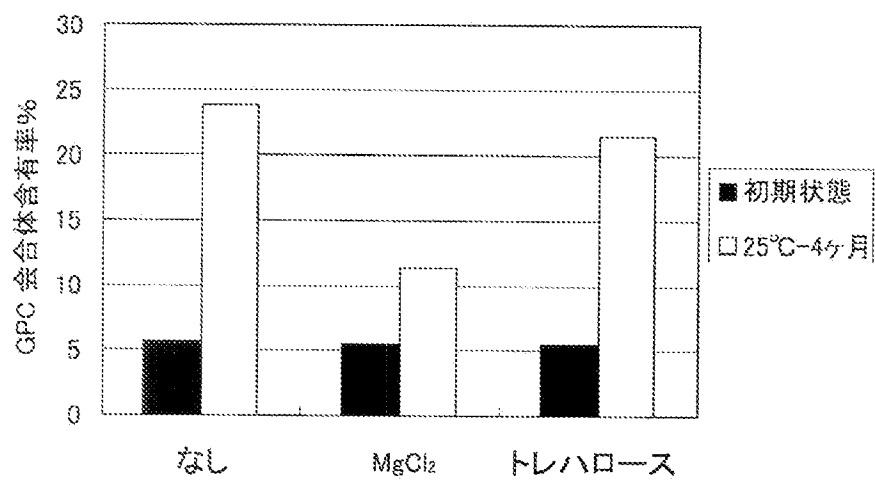
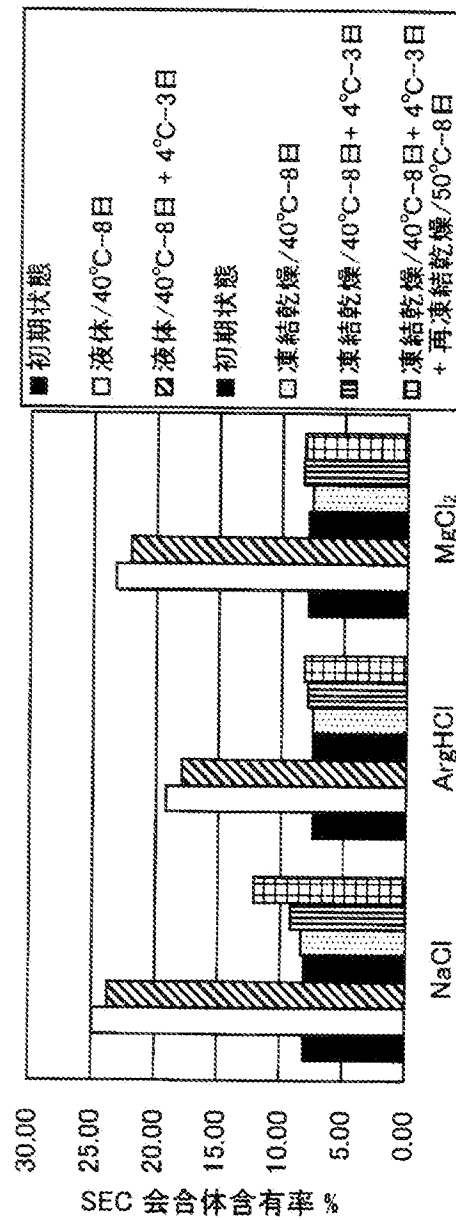


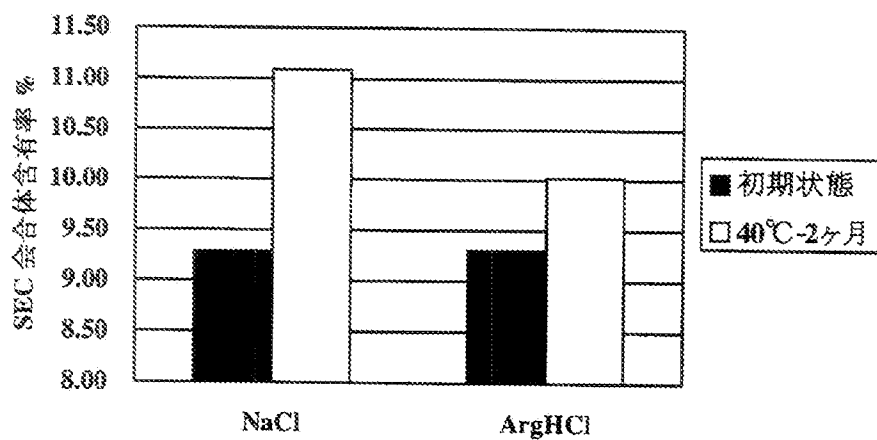
図4

	初期状態	液体/40°C-8日 + 4°C-3日	初期状態	凍結乾燥/40°C-8日 + 4°C-3日	凍結乾燥/40°C-8日 + 4°C-3日	凍結乾燥/40°C-8日 + 再凍結乾燥/50°C-8日
NaCl	8.10	24.93	23.76	8.10	8.37	12.15
ArgHCl	7.48	19.20	17.89	7.48	7.48	8.17
MgCl <sub>2</sub>	7.87	23.20	22.04	7.87	7.56	8.18

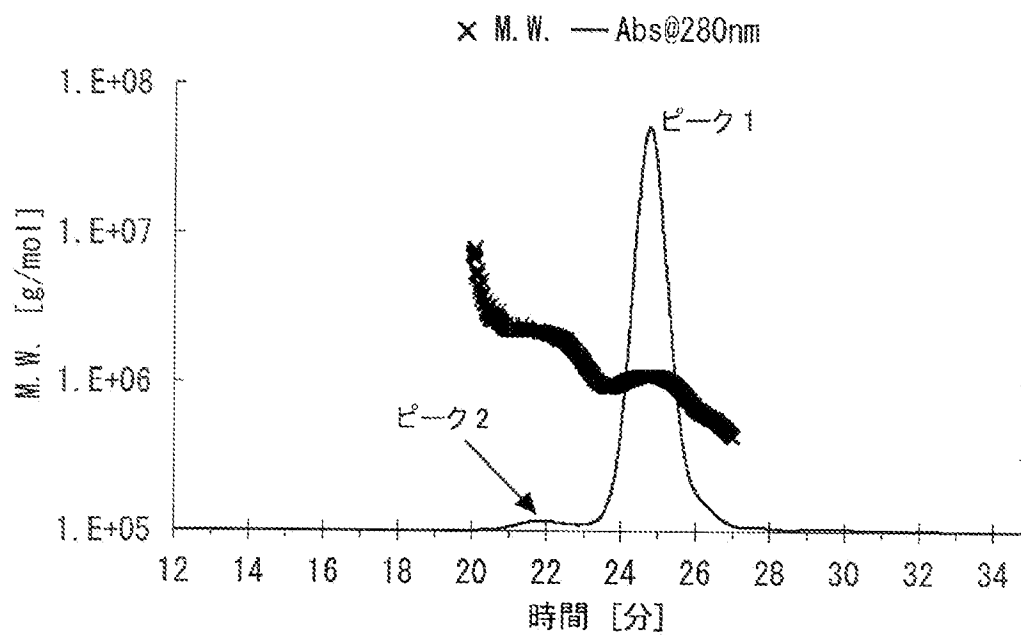


[図5]

	初期状態	40°C-2ヶ月	$\Delta$ 40°C-2ヶ月
NaCl	9.28	11.09	1.81
ArgHCl	9.30	10.02	0.72



[図6]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014935

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/00, A61K9/08, 39/395, 47/02, 47/18, 47/26, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/00, A61K9/08, 39/395, 47/02, 47/18, 47/26, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (SNT), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2001-504092 A (Rotkreuzstiftung Zentrallaboratorium Blutspendedienst SRK), 27 March, 2001 (27.03.01), Claims; examples & EP 835880 A1 & WO 98/16558 A1 & US 6136312 A1	1-4, 9 10, 11
X A	JP 9-127114 A (Dainabot Co., Ltd.), 16 May, 1997 (16.05.97), Claims; example 1; Fig. 1 (Family: none)	1-3, 9, 10 4, 11
X A	JP 9-127112 A (Dainabot Co., Ltd.), 16 May, 1997 (16.05.97), Claims; example 1; Fig. 1 (Family: none)	1-3, 9-11 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
04 January, 2005 (04.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014935

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2-786335 A (Biotest Wolfram), 19 March, 1990 (19.03.90), Claims; page 3, upper left column; examples & EP 352500 A & US 5190752 A	1-4, 9 10, 11
X A	JP 2-493 A (Miles Inc.), 05 January, 1990 (05.01.90), Claims; examples; page 5, upper right column & EP 303088 A & US 5157113 A	1-4, 9, 10 11
X	GOMBOTZ WR et al., "The stabilization of a human IgM monoclonal antibody with poly (vinylpyrrolidone)." Pharm Res., 1994, Vol.11, No.5, page 624-32	1-4, 9-11
A	DRAHER P. et al., "Stability of monoclonal IgM antibodies freeze-dried in the presence of trehalose." J Immunol Methods., 1995, Vol.181, No.1, pages 37 to 43	1-4, 9-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014935

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 35 is the stabilization of an IgM solution of a high concentration.

The search has revealed that the document (JP 2001-504092 A (Rotkreuzstiftung Zentrallaboratorium Blutspendedienst SRK) 27 March, 2001 (27.03.01)) describes a stabilized IgM solution of a high concentration, and thus, it has become clear that the above common matter is disclosed in said document and therefore is not novel. As a result, the stabilization of an IgM solution of a high concentration falls within the scope of the prior art, and therefore, the common matter cannot be a special technical feature. Accordingly, the inventions according to claims 1 to 35 (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 4 and 9 to 11

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014935

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

are classified into a group of inventions according to claims 1 to 4 and 9 to 11 relating to a solution containing a stabilized immunoglobulin at a high concentration, wherein the immunoglobulin is IgM, a group of inventions according to claims 5 to 8, 13 to 22, 24 to 34 having a technical feature of a high concentration IgM solution containing a multi-valent cationic ion, and a group of inventions according to claims 12, 23 and 35 having a technical feature of the freezing or freeze-drying of a stabilized IgM solution of a high concentration.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C07K16/00, A61K9/08, 39/395, 47/02, 47/18, 47/26, A61P35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C07K16/00, A61K9/08, 39/395, 47/02, 47/18, 47/26, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN) BIOSIS (STN) WPIDS (STN) JICST7744 (JOLIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2001-504092 A (ロクレツシュエツツク・ゼントラルホ・トリウム・ブルペン・デ・イェン シュト・エス・アル・ケイ) 2001. 03. 27, 特許請求の範囲, 実施例 & EP 835880 A1 & WO 98/16558 A1 & US 6136312 A1	1-4, 9 10, 11
X A	JP 9-127114 A (ダイボット株式会社) 1997. 05. 16, 特許請求の範囲 , 実施例 1, 図 1 (ファミリーなし)	1-3, 9, 10 4, 11
X A	JP 9-127112 A (ダイボット株式会社) 1997. 05. 16, 特許請求の範囲 , 実施例 1, 図 1 (ファミリーなし)	1-3, 9-11 4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 04. 01. 2005		国際調査報告の発送日 25. 1. 2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 4N 9739 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2-786335 A(ヒトオナモミ フアルマゲゼン アフタ ミット ベンシレンクター ハフツング) 1990.03.19, 特許請求の範囲, 第3頁左上欄, 実施例 & EP 352500 A & US 5190752 A	1-4, 9 10, 11
X A	JP 2-493 A(マウス・インコーポレート) 1990.01.05, 特許請求の範囲, 実施 例, 第5頁右上欄 & EP 303088 A & US 5157113 A	1-4, 9, 10 11
X	GOMBOTZ WR, et. al., "The stabilization of a human IgM monoclonal antibody with poly(vinylpyrrolidone)." Pharm Res., 1994, Vol. 11, No. 5, p. 624-32	1-4, 9-11
A	DRABER P, et. al., "Stability of monoclonal IgM antibodies freeze-dried in the presence of trehalose." J Immunol Methods., 1995, Vol. 181, No. 1, p. 37-43	1-4, 9-11

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-35に共通の事項は、高濃度I g M溶液の安定化である。

しかしながら、調査の結果、文献 (JP 2001-504092 A (ロトリーシェイプング・セントラルボラトリウム・ブレンディング・エッセンス・ケイ) 2001.03.27) には、高濃度I g M安定化溶液が記載されており、上記共通の事項は当該文献に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。結果として、高濃度I g M溶液の安定化は、先行技術の域をでないから、この共通事項は特別な技術的特徴とすることはできない。それ故、請求の範囲1-35に記載の発明は、請求の範囲1-4、9-11に記載される、高濃度の免疫グロブリンが安定化された溶液であって免疫グロブリンがI g Mである溶液に関する発明群と、請求の範囲5-8、13-22、24-34に記載される、高濃度I g M溶液において多価カチオン性イオンを含有することに技術的特徴を有する発明群と、請求の範囲12、23、35に記載される、高濃度安定化I g M溶液を凍結又は凍結乾燥することに技術的特徴を有する発明群に区分される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-4、9-11

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。